

# 內皮素(endothelin-1)對天竺鼠心室肌細胞鈣離子及鉀離子電流的作用

童麗珠\* 林金盾

國立臺灣師範大學生命科學系

(收稿日期：2003.8.6，接受日期：2004.11.8)

## 摘 要

內皮素 (endothelin, ET-1) 是由 21 個胺基酸組成的胜肽，能促使血管收縮、細胞分裂及心肌收縮。本研究利用傳統玻璃電極進行細胞內記錄來測試天竺鼠心室乳頭肌的動作電位、利用張力轉換器來記錄乳頭肌收縮力；利用全細胞膜片箝 (whole-cell patch clamp) 技術來記錄酵素分離的單一心室肌細胞之鈣離子及鉀電流。10 nM ET-1 的處理對乳頭肌的動作電位及其持續時間均沒有影響。但可迅速的、顯著的增加乳頭肌收縮力達原來的 225%，收縮力在除去 ET-1 清洗 2 分鐘後是能恢復的。10 nM ET-1 處理單一心室細胞可以抑制其向內 L 型鈣離子電流 ( $I_{Ca,L}$ )，此抑制的藥效很快，在處理 3、6 至 9 分鐘時可分別減少 15、24、33%，處理 12 分鐘抑制才見漸平穩，以不含 ET-1 灌流液清洗 20 分鐘  $I_{Ca,L}$  會有少許的恢復。藥物的處理使鈣離子電流高峰由膜電位 0 mV 轉至 10 mV 時。但 ET-1 對隨著時間增加的外向鉀離子電流 ( $I_K$ ) 則沒有明顯的作用。此現象可推論 ET-1 增加乳頭肌收縮力，並非經由增加鈣離子向內流來引起作用的。

關鍵詞：內皮素，L 型鈣離子電流，心室肌細胞，天竺鼠

## 緒 言

內皮素 (endothelin, ET-1) 首次分離自培養的豬主動脈內皮細胞之培養液的一種血管收縮胜肽(vasoconstrictor peptide) (Yanagisawa *et al.*, 1988)，已知可自不同的心血管細胞包括內皮細胞、血管平滑肌細胞和心肌細胞產生，再釋放入血液。它有促進正的心肌收縮效應 (positive inotropic effect)，有此效應的包括有天竺鼠、大鼠、雪貂、兔、狗、人類等報導 (Ishikawa *et al.*, 1988; Shah *et al.*, 1989; Watanabe *et al.*, 1989; Kramer *et al.*, 1991; Chu and Endoh,

2000; Banyasz *et al.*, 2001; Dhein *et al.*, 2001; Saetrum Opgaard *et al.*, 2001; Talukder *et al.*, 2001)。能加強心肌的收縮力，勢必要增加心肌細胞質的鈣離子濃度，隨著 ET-1 劑量的增加會使心肌細胞內鈣離子濃度增加 (Hirata *et al.*, 1989; Yang *et al.*, 1999)，此與 ET-1 增加心肌收縮力之作用一致。但各研究報導 ET-1 的處理對心肌 L 型鈣離子向內電流 ( $I_{Ca,L}$ ) 並沒有促進作用。 $I_{Ca,L}$  對調整正心肌收縮及心跳效應上所扮演的角色仍多有爭論 (Xie *et al.*, 1996)。

本研究是先利用傳統玻璃電極的細胞內記

錄法及肌肉張力測定法，測試 ET-1 對天竺鼠心室乳頭肌之動作電位及收縮張力的作用；再直接利用單電極全細胞膜片箱 (whole-cell patch clamp) 技術，來探測 ET-1 對天竺鼠單一心室細胞鈣離子及鉀離子電流的影響。

## 材料與方法

### 實驗動物及材料

天竺鼠(guinea pig)為研究級動物房所飼養。實驗所用的藥劑均購自 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO)。

### 乳頭肌標本之製備及實驗

雄天竺鼠經頸柱擊昏後，開心剪取心室乳頭肌進行動作電位及收縮力的測定。離體乳頭肌標本置於 37 °C 組織皿中，以 97 % O<sub>2</sub> 及 3 % CO<sub>2</sub> 混合氣飽和的 Tyrode 溶液以等流速 (6 ml/min) 灌注，電刺激條件為 1 Hz 的頻率、大於 25% 閾值的強度及 2 ms 的持續時間。實驗前標本先電刺激一小時使其穩定，再以灌有 3M KCl 的玻璃電極 (尖端電阻為 10 至 20 MΩ) 進行細胞內記錄。電位訊號經放大後，連接於 Gould ES 1000 recorder 來記錄。收縮力的測定，係以張力轉換器 (Grass FT03C, force-displacement transducer) 轉換後，再一起連接於 Gould ES 1000 recorder 記錄。

### 心肌細胞的分離

單一細胞的分離乃根據 Mitra 和 Morad (1985) 所述利用酵素分解的方法來進行。其方法是取重約 300-500 克的雄天竺鼠，頸柱擊昏後，迅速取出心臟，經 HEPES-Tyrode 溶液清洗後，將此心臟以主動脈插管方式連接於 Langendorff 灌流裝置，在 37 °C，100% 氧氣飽

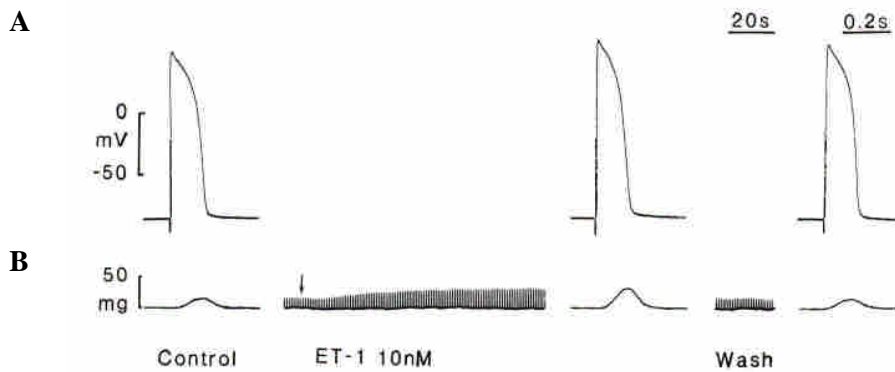
和，以 collagenase 和 protease 兩酵素處理，來分離出單一心肌細胞。

全細胞膜片箱記錄 (whole-cell patch clamp recording)

係採用吸破膜片箱技術 (ruptured patch-clamp technique)，即在室溫下 (20-25 °C)，將置於標本槽內的單一心肌細胞和吸吮電極 (尖端直徑 1μm 左右，電阻 3-5 MΩ) 完成細胞膜緊密接合 (電阻達 10-100 GΩ) 後，再給予吸力來吸破電極尖端的小片細胞膜，完成全細胞膜片箱紀錄裝置。細胞和電極內各依欲測之鈣或鉀離子電流，而分別採用不同成份的灌流溶液及電極溶液來進行實驗。細胞在預設程序的電位固定後，所得電流訊號經 Axoclamp-2A (Axon Company, USA)，放大收集送入轉換器 (LabMaster TM40 interface; Scientific Solutions, Foster City, USA)，將類比形式的資料轉換成數位形式後，輸入電腦由 pCLAMP 軟體 (Axon Instruments, Foster City, USA) 執行資料的讀取、測量、分析。

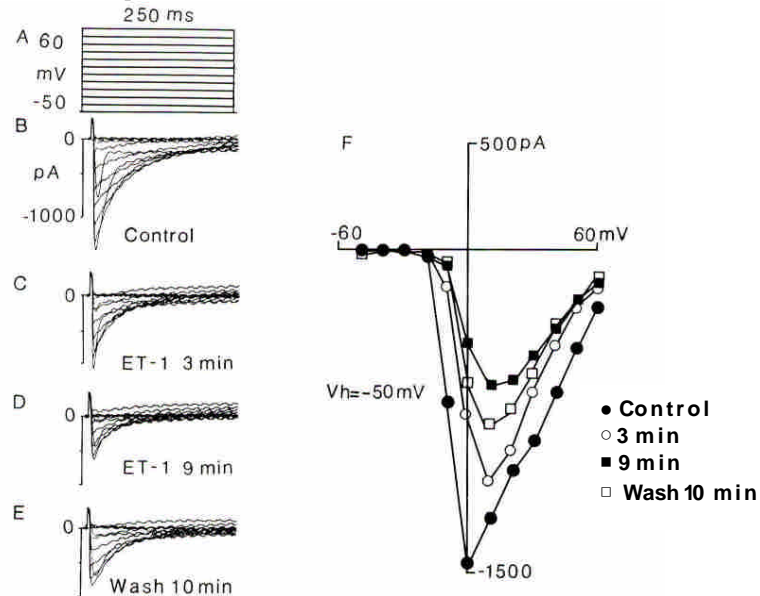
### 離子電流的測定

向內 L 型鈣離子電流 (L-type inward Ca<sup>2+</sup> current, I<sub>Ca, L</sub>) 的測定係採用 Loh 等(1992)方法。灌流溶液的成分為: Tris (hydroxymethyl) aminomethane 137.6, CaCl<sub>2</sub> 5.5, MgCl<sub>2</sub> 1, CsCl 20 和葡萄糖 27.5 mM; 電極溶液的成分為: CsCl 125, MgATP 5, EGTA 15, tetraethylammonium Cl (TEACl) 20 和 HEPES 10 mM, pH7.2 (以 1N CsOH 調)。在此細胞內外液均不含鈉、鉀離子，且又有鉀離子阻斷劑-CsCl 及 TEACl 的存在下，可完全除去鈉及鉀離子電流的干擾。實驗開始先將細胞膜電位固定在 -50 mV，以使 T 型的鈣離子通道和快速鈉離子通道不活化。細胞在完成全細胞膜電位狀態後，先維持在此種細



圖一、ET-1 對天竺鼠心室乳頭肌動作電位及機械作用。(A)圖為乳頭肌的動作電位紀錄；(B)圖為乳頭肌收縮的機械力記錄。箭頭所指為藥物開始處理點。

**Figure 1.** The electrical and mechanical effects of 10 nM Endothelin-1(ET-1) on guinea-pig ventricular papillary muscle in normal Tyrode solution. Preparation was driven by 2 ms duration stimulus at 1 Hz. Traces of action potential (A) and twitch force (B) were recorded at fast and slow chart speeds as indicated by different time scales. The arrowhead indicates the beginning of drug exposure. After washing in ET-1 free superfusate for 2 min, effect of ET-1 on the contractile force was reversed.



圖二、ET-1 對天竺鼠心室 L 型鈣離子電流( $I_{Ca,L}$ )的作用。(A) 為鈣離子電流記錄的條件，敘述詳見材料與方法。分別有 ET-1 處理前 (B)、10 nM ET-1 處理 3 分鐘 (C)、9 分鐘 (D) 及用不含 ET-1 的灌流液清洗 10 分鐘 (E) 之  $I_{Ca,L}$  的記錄圖。(F) 為鈣離子向內尖峰電流-電位圖。分別有 ET-1 處理前 (●)、處理 3 分鐘 (○)、9 分鐘 (■) 及用不含 ET-1 的灌流液清洗 10 分鐘 (□) 的曲線。

**Figure 2.** The  $Ca^{2+}$  currents recorded from a single ventricular cell in the absence (Control, B), and presence of 10 nM Endothelin-1 (ET-1) after 3 (C) and 9 min (D) superfusion, and after washout in ET-1 free superfusate for 10 min (E). Holding potential ( $V_h$ ) was -50 mV and voltage step potentials were from -40 to +60 mV in 10 mV steps as indicated in (A). In (F) are the before (●), during 3 (○) and 9 min (■) ET-1 superfusion, and after washing in ET-1 free superfusate for 10 min (□).

胞內外溶液條件下穩定約 20 分鐘，以將所謂衰減 (run down) 的干擾減至最低 (Belles *et al.*,

1988)。實驗時將膜電位以 10mV 為單位增加，瞬間去極化至 11 個不同大小的測試電位(從-40

mV 到+60 mV)，維持 250 ms 後，再回到原來的固定電位值 (-50 mV)，每個測試電位的間隔時間為 2 秒 (圖二 A)。I<sub>Ca,L</sub> 的測量數值乃是取內向最大值與固定電位 250 ms 末 steady-state current 之差。

對時間依賴性外向鉀離子電流 (time-dependent outward K current, I<sub>K</sub>) 的測定係採用 Roden 等(1988)和 Loh 等(1992)方法。實驗前細胞先置於室溫中，灌流 30 分鐘，使其穩定。灌流溶液的成分為：NaCl 137.6, KCl 5.4, CaCl<sub>2</sub> 1.8, MgCl<sub>2</sub> 0.5, HEPES 11.5 和葡萄糖 22 mM；電極溶液的成分為：KCl 120, MgCl<sub>2</sub> 6, Na<sub>2</sub>ATP 5, HEPES 10, EGTA 5 和 CaCl<sub>2</sub> 0.15 mM, pH7.2 (以 1 N KOH 調)。實驗時首先將細胞膜電位固定在 -70 mV，再瞬間變化至 +20 mV，來活化 I<sub>K</sub> 電流，然後以 0.3 秒為一個單位，將細胞膜電位固定在 +20 mV 處維持 6 個不同持續時間 (0.3 秒-1.8 秒) 後，再將膜電位

固定回 -30 mV (圖三 A)，而於再極化到 -30 mV 時，便可測量到此 I<sub>K</sub> 的末端電流 (tail current)。

#### 數據的統計

實驗所得數據以平均值±標準差 (mean ± SE) 來表示。並以配對 Student's t 試驗作統計分析，統計顯著水準在  $P < 0.05$ 。

## 結 果

### ET-1 對心室乳頭肌的作用

10 nM ET-1 的處理並沒有影響乳頭肌的動作電位振幅和持續時間。但影響收縮力的反應極迅速，在處理 10 秒鐘時就有上升趨勢，處理 2 分鐘時可增為原來的 225%，達其最大收縮力。ET-1 作用 4 分鐘後，以不含 ET-1 的溶液清洗 2 分鐘，收縮力就可恢復至原來大小 (圖一)。

表一、ET-1 對天竺鼠心室細胞 L 型鈣離子電流( $I_{Ca,L}$ )的抑制作用。表中呈現 10 nM ET-1 所誘導細胞之鈣離子向內電流變化之百分比。\* $P < 0.05$ .

**Table 1.** Inhibition of L-type  $Ca^{2+}$  current ( $I_{Ca,L}$ ) induced by 10 nM Endothelin-1 in guinea-pig ventricular myocytes.

Condition	$I_{Ca,L}$ (change in %)
ET-1 10 nM	
3 min	-15.0 ± 3.8*
6 min	-23.9 ± 5.9*
9 min	-32.8 ± 7.3*
12 min	-31.7 ± 7.5*
Wash	
5 min	-34.3 ± 10.4*
10 min	-31.7 ± 13.0*
15 min	-35.4 ± 13.3*
20 min	-36.5 ± 15.6

All experiments were started after superfused in Tris solution for 20 min. Number of preparations were seven. Values are means ± SE of the percentage reduction in  $I_{Ca,L}$  as compared with the control values before drug exposure.

\*  $P < 0.05$ , significantly different from control; paired Student's t-test.

#### ET-1 對向內 L 型鈣離子電流 ( $I_{Ca,L}$ ) 的作用

如圖二所示當膜電位由 -50 mV 的固定電位去極化至 0 mV 的測試電位時,在控制組可測到最大的  $I_{Ca,L}$  電流 (約 1300 pA)。10 nM ET-1 處理對天竺鼠心室肌細胞  $I_{Ca,L}$  之藥效作用很快,在處理 3、6 至 9 分鐘時呈急速抑制,可分別降低  $I_{Ca,L}$  15、24 及 33%,處理到 12 分鐘抑制才漸平穩。此種抑制作用在藥物洗掉 10 分鐘後,有少許的恢復,呈  $I_{Ca,L}$  下降趨緩,但變異很大,洗至 20 分鐘,稍有恢復,但變異愈大 (SE 愈大) (表一)。同時觀察到在 ET-1 處理及清洗時,能測到的最大  $I_{Ca,L}$  電流由膜電位 0 mV 轉至 10 mV 時 (圖二 F)。

表二、ET-1 對天竺鼠心室細胞之時間依賴外出鉀離子電流  $I_K$  的作用。10 nM ET-1 所誘導細胞之  $I_K$  變化之百分比 ( $\Delta\%$ )。

**Table 2.** Percentage changes in the time-dependent outward  $K^+$  current ( $I_K$ ) induced by Endothelin-1 in guinea-pig ventricular myocytes superfused in normal HEPES-Tyrode solution.

condition	n	step					
		1	2	3	4	5	6
		( $\Delta\%$ )	( $\Delta\%$ )	( $\Delta\%$ )	( $\Delta\%$ )	( $\Delta\%$ )	( $\Delta\%$ )

#### ET-1 對時間依賴性外向鉀離子電流 ( $I_K$ ) 的作用

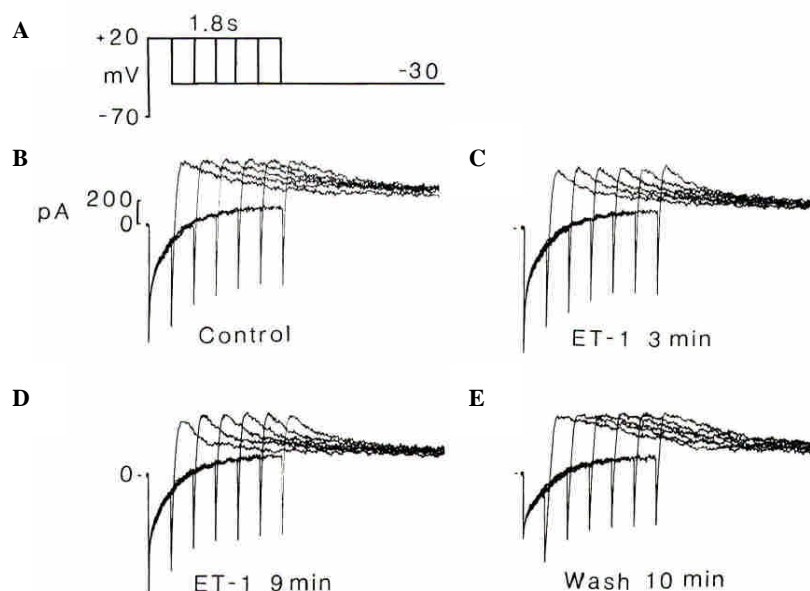
處理 10 nM ET-1 或處理後清洗對天竺鼠心室細胞的  $I_K$  尾電流都無明顯的作用,在 6 個不同持續時間 (0.3-1.8 秒) 均沒有明顯變化,只呈現出變異愈來愈大 (SE 愈大) (表二、圖三)。

#### 討論

ET-1 對心肌細胞的作用是相當分歧與矛盾的,有許多報導認為強烈的與實驗時的條件、樣本的來源 (物種、心房、心室..) 及發育的情況 (胚胎、成體..) 有關。本研究觀察到 ET-1 可增加天竺鼠心室乳頭肌的收縮力,而對動作電位和其持續時間沒有明顯的作用。這個現象與一些學者的研究是一致的 (Ishikawa *et al.*, 1988; Yanagisawa *et al.*, 1988; Shah *et al.*, 1989; Watanabe *et al.*, 1989; Kramer *et al.*, 1991; Kobayashi *et al.*, 1996)。在這方面不同論點的報導有:認為 ET-1 並沒有正的心肌收縮效應,只是增加靜止收縮張力 (Volkman *et al.*, 1990); 8-10 nM ET-1 處理不單獨影響狗心室肌細胞的收縮力 (Banyasz *et al.*, 2001) 或呈長期持續的負收縮效應(long-lasting negative inotropic effect) (Chu 和 Endoh, 2000); 對小鼠心室的收縮力效應是與處理 ET-1 的濃度有關 (Izumi *et al.*, 2000) 等等。

ET-1 10 nM							
3 min	7	0.5 ± 5.7	-0.4 ± 4.7	-4.0 ± 5.2	4.2 ± 3.6	3.1 ± 5.3	7.0 ± 4.2
6 min	6	-7.4 ± 7.9	8.1 ± 5.6	-6.5 ± 5.7	7.8 ± 5.2	-0.7 ± 4.9	2.9 ± 5.2
9 min	4	-7.6 ± 9.7	1.6 ± 5.6	-1.1 ± 7.2	5.4 ± 4.7	5.1 ± 8.4	4.9 ± 8.0
12 min	5	-9.7 ± 10.6	-3.3 ± 9.9	7.2 ± 11.1	4.7 ± 1.9	5.3 ± 8.3	10.6 ± 7.4
Wash							
5 min	3	30.7 ± 24.8	20.8 ± 25.1	0.2 ± 21.7	7.4 ± 25.6	-4.2 ± 20.4	14.4 ± 13.9
10 min	3	-29.0 ± 12.7	-18.2 ± 20.0	-16.4 ± 16.9	-11.8 ± 21.9	-1.9 ± 33.9	-4.4 ± 28.7

Values are means ± SE of the percent changes ( $\Delta\%$ ) in  $I_K$  compared to control values before drug exposure.



圖三、ET-1 對天竺鼠心室細胞鉀離子電流( $I_K$ )的時間依賴性的作用。A 圖所示為記錄鉀離子電流條件，敘述詳見材料與方法。圖上分別有 ET-1 處理前(B)、處理 3 分鐘(C)、9 分鐘(D)及用不含 ET-1 的灌流液清洗 10 分鐘(E)的曲線。

**Figure 3.** Effect of 10 nM Endothelin-1 (ET-1) on time-dependent outward  $K^+$  current ( $I_K$ ) in a single guinea-pig ventricular myocyte. Membrane potential was held at -70 mV, conditioned to +20 mV for 0.3, 0.6, 0.9, 1.2, 1.5 and 1.8 s, and then repolarized to -30 mV as indicated in A. Traces obtained are shown in: B) before treatment (control), C) at 3 and D) 9 min of ET-1 superfusion, and E) after washing in ET-1 free superfusate for 10 min.

本研究 ET-1 不影響天竺鼠單一心肌細胞的  $I_K$ 。與 Banyasz 等(2001)在狗的心室細胞也證明 8 nM ET-1 並不影響  $I_K$  (delayed rectifier potassium current)  $I_{K1}$  (inward rectifier K current) 一致。然抑制  $I_K$  的報導有：James 等(2001)認為 ET-1 對大鼠心室肌細胞可極顯著的降低靜止狀態 (steady-state) 鉀離子電流，以造成 ET-1 的正收縮效應；Kobayashi 等 (1996) 30 nM ET-1 處理天竺鼠心室肌細胞能部份的抑制  $I_{K,ATP}$  (ATP-sensitive  $K^+$  current)；Magyar 等 (2000) 以 8 nM ET-1 處理人類沒病症的心室肌細胞， $I_k$  降低為原來的 20%。但也有 ET-1 則會

增加心肌細胞  $I_K$  之向外電流之報導 (Habuchi *et al.*, 1992; Haber and Lee 1994) ET-1 如此截然不同作用的反應機制仍有待進一步探討。

在本研究 ET-1 明顯的抑制天竺鼠心肌細胞  $I_{Ca,L}$ 。當然  $I_{Ca,L}$  的下降有部份是本身在實驗過程中依時間的衰減結果。本  $I_{Ca,L}$  實驗測定中，電極溶液中添加 ATP 和 EGTA 等，用以對抗細胞內 phosphorylation factors 的被稀釋，以維持細胞內低鈣濃度，以降低  $I_{Ca,L}$  的衰減。同時每次實驗都先灌流 20 分鐘，俟  $I_{Ca,L}$  衰減趨穩定才進行實驗。經對照組證實在 50 分鐘內，其  $I_{Ca,L}$  的衰減小於 10%。所以本研究是可確定 ET-1 有

抑制天竺鼠心室肌細胞  $I_{Ca,L}$  的作用。依報導 ET-1 對心室肌細胞之  $I_{Ca,L}$  作用會因實驗動物的種類、ET-1 處理濃度的不同 (Talukder *et al.*, 2001)、實驗條件 (Habuchi *et al.*, 1992; Chu and Endoh, 2000) 或實驗方式 (Kelso *et al.*, 1996) 的不同而異。Habuchi 等(1992)指出 ET-1 會增加天竺鼠心室肌細胞  $I_K$  之向外電流，對內流鈣電流沒有抑制作用與本研究不同。Habuchi 等用於測  $I_{Ca,L}$  的 bath solution 是 normal Tyrode 溶液 (含 1.0 mM  $Ca^{++}$ )，與本研究所用的 Tris 溶液 (含 5.4 mM) 不同，結果有可能因而不同。Kelso 等 (1996) 以免的心室肌細胞為材料，與本研究相同用吸破膜片箝技術 (ruptured patch-clamp technique) 實驗發現 10 nM 的處理是降低  $I_{Ca,L}$ ，這與本研究的結果是一致的。且 ET-1 在心室肌細胞上的專一的受器，並不會與鈣離子通道的阻抗劑 (antagonist) 結合 (Hirata *et al.*, 1989)。藉由拮抗劑和 ET-1 的接受器結合等實驗的推論，認為 ET-1 對心室的效應並不是藉由鈣離子電流來調控的 (Ishikawa *et al.*, 1988; Watanabe *et al.*, 1989; Cheng *et al.*, 1995)。所以推測 ET-1 對心室肌細胞的作用是經由多重的訊息路徑。

增加肌細胞質內鈣離子的濃度，才能使肌肉收縮。ET-1 已被證明可劑量依賴的增加細胞內鈣離子濃度，而有正的心室肌收縮效應 (Hirata *et al.*, 1989)，且認為不是藉由鈣離子電流來調控 (Ishikawa *et al.*, 1988; Watanabe *et al.*, 1989)。分析其可能原因為：ET-1 誘導接受器調節的機制，而增加細胞內鈣離子濃度 (Hirata *et al.*, 1989; Kelso *et al.*, 2000)；部份可能藉由 Protein kinase C 的調節路徑，升高細胞內 pH 值，促使細胞的肌蛋白絲對細胞內鈣離子敏感性增加引起的 (Kramer *et al.*, 1991; Yang *et al.*,

1999)。然在心室肌細胞理論上抑制鈣離子電流，動作電位持續期間是要縮短的，本研究 ET-1 抑制心室肌細胞鈣離子電流，對乳頭肌動作電位期間沒有縮短作用，對心室收縮力反而有增強效果之現象，在 Magyar 等(2000) 以 8 nM ET-1 處理人類沒病症的心室肌細胞，也是顯著的降低  $I_{Ca,L}$  33.3%，且清洗後有少許的恢復。而他們用傳統的微電極記錄 ventricular trabecula 的動作電位並沒有變化，且持續時間 APD<sub>50</sub> (50% of repolarization) 並沒有縮短反而稍增；Kobayashi 等(1996) 報導 30 nM ET-1 的處理可使天竺鼠的乳頭肌收縮力增加，但動作電位的持續時間沒有變化；Ishikawa 等(1988) 在天竺鼠心房實驗也得相同的結果，所以理論上抑制心室肌細胞鈣離子電流，心室肌組織動作電位持續期間是要縮短的現象，並沒有得到一致的結果。取單一心室肌細胞與乳頭肌組織來比較 ET-1 作用的反應，Talukder 等(2001) 在兔子的實驗指出兩者在 concentration dependence、反應特性及對 ET-1 接受器之拮抗劑的感受性是不同的，他們認為 ET-1 誘導乳頭肌的反應有非心室肌細胞統整調節機制的參與。因此在單一細胞層次與組織層次來比較 ET-1 的作用之關連，仍需進一步釐清。

## 誌謝

感謝國防大學院生理研究所林正一教授提供本研究所使用的之材料、研究設備、技術指導及研究諮詢；並感謝羅時鴻、鄭志鴻先生在實驗過程的協助。

## 參考文獻

Banyasz T, Magyar J, Kortvely A, Szigeti G, Szigligeti P, Papp Z, Mohacsi A, Kovacs L

- and Nanasi PP. 2001. Different effects of endothelin-1 on calcium and potassium currents in canine ventricular cells. *Naunyn-Schmiedeberg's archives Pharmacol.* **363**:383-390.
- Belles B, Malecot CO, Hescheler J and Trautwein W. 1988. "Run-down" of the Ca current during long whole-cell recordings in guinea pig heart cells: role of phosphorylation and intercellular calcium. *Eur. J. Pharmacol.* **411**:353-360.
- Cheng TH, Chang CY, Wei J and Lin CI. 1995. Effects of endothelin 1 on calcium and sodium currents in isolated human cardiac myocytes. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **73**:1774-1783.
- Chu L and Endoh M. 2000. Biphasic inotropic response to endothelin-1 in the presence of various concentrations of norepinephrine in dog ventricular myocardium. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **36**:S9-14.
- Dhein S, Giessler C, Wangemann T, Silber RE, Zerkowski HR and Brodde OE. 2000. Differential pattern of endothelin-1-induced inotropic effects in right atria and left ventricles of the human heart. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **36**:564-569.
- Haber E and Lee ME. 1994. Endothelin to the rescue? *Nature* **370**:252-253.
- Habuchi Y, Tanaka H, Furukawa T, Tsujimura Y, Takahashi H and Yoshimura M. 1992. Endothelin enhances delayed potassium current via phospholipase C in guinea pig ventricular myocytes. *Am. J. Physiol.* **262**:H345-354.
- Hirata Y, Yoshimi H, Emori T, Shichiri M, Marumo F, Watanabe TX, Kumagaye S, Nakajima K, Mimura T and Sakakibara S. 1989. Receptor binding activity and cytosolic free calcium response by synthetic endothelin analogs in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **160**:228-234.
- Ishikawa T, Yanagisawa M, Kimura S, Goto K and Masaki T. 1988. Positive inotropic action of novel vasoconstrictor peptide endothelin on guinea pig atria. *Am. J. Physiol.* **255**:H970-973.
- Izumi M, Miyamoto S, Hori M, Ozaki H and Karaki H. 2000. Negative inotropic effect of endothelin-1 in the mouse right ventricle. *Eur. J. Pharmacol.* **396**:109-117.
- James AF, Ramsey JE, Reynolds AM, Hendry BM and Shattock MJ. 2001. Effects of endothelin-1 on K<sup>+</sup> currents from rat ventricular myocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **284**:1048-55.
- Kelso E, Spiers P, McDermott B, Scholfield N and Silke B. 1996. Dual effects of endothelin-1 on the L-type Ca<sup>2+</sup> current in ventricular cardiomyocytes. *Eur. J. Pharmacol.* **308**:351-355.
- Kobayashi S, Nakaya H, Takizawa T, Hara Y, Kimura S, Saito T and Masuda Y. 1996. Endothelin-1 partially inhibits ATP-sensitive K<sup>+</sup> current in guinea pig ventricular cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **27**:12-19.
- Kramer BK, Smith TW and Kelly RA. 1991. Endothelin and increased contractility in adult rat ventricular myocytes: Role of intracellular alkalosis induced by activation of the protein kinase C-dependent Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger. *Circ. Res.* **68**:269-279.
- Loh SH, Lee AR, Huang WH and Lin CI. 1992. Ionic mechanisms responsible for the antiarrhythmic action of dehydroevodiamine in guinea-pig isolated cardiomyocytes. *Br. J. Pharmacol.* **106**:517-523.
- Magyar J, Iost N, Koertvely A, Banyasz T, Virag L, Szigligeti P, Varro A, Opincariu M, Szecsi J, Papp JG and Nanasi PP. 2000. Effects of endothelin-1 on calcium and potassium currents in undiseased human ventricular myocytes. *Pfluegers Archl.* **441**(1):144-149.
- Mitra R and Morad M. 1985. A uniform enzymatic method for dissociation of myocytes from hearts and stomachs of vertebrates. *Am. J. Physiol.* **249**:H1056-1060.
- Roden, DM, Bennett PB, Snyders DJ, Balser JR and Hondeghem LM. 1988. Quinidine delays I<sub>K</sub> activation in guinea pig myocytes. *Circ. Res.* **62**:1055-1088.
- Saetrum Opgaard O, Adner M, Peters TH, Xu CB, Stavenow L, Gulbenkian S, Erlinge D, Edvinsson L and Sharma HS. 2001. Endocardial expression and functional characterization of endothelin-1. *Mol. Cell. Biochem.* **224**:151-158.
- Shah AM, Lewis MJ and Henderson AH. 1989.



- Inotropic effects of endothelin in ferret ventricular myocardium. *Eur. J. Physiol.* **163**:365-367.
- Talukder MAH, Norota I, Sakurai K and Endoh M. 2001. Inotropic response of rabbit ventricular myocytes to endothelin-1 difference from isolated papillary muscles. *Am. J. Physiol.* **281**:H596-605
- Volkman R, Bokvist K and Wennmalm A. 1990. Endothelin has no positive inotropic effect in guinea-pig atria or papillary muscle. *Acta. Physiol. Scand.* **138**:345- 348.
- Watanabe R, Kusumoto K, Kitayoshi T and Shimamoto N. 1989. Positive inotropic and vasoconstrictive effects of endothelin-1 in vivo and in vitro experiments: characteristics and the role of L-type calcium channels. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **13**:S108-111.
- Xie LH, Horie M, James AF, Watanuki M and Sasayama S. 1996. Endothelin-1 inhibits L-type Ca currents enhanced by isoproterenol in guinea-pig ventricular myocytes. *Eur. J. Physiol.* **431**:533-539.
- Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K and Masaki T. 1988. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature (Lond)* **332**:411-415.
- Yang HT, Sakurai K, Sugawara H, Watanabe T, Norota I and Endoh M. 1999. Role of  $Na^+/Ca^{2+}$  exchange in endothelin-1 induced increases in  $Ca^{2+}$  transient and contractility in rabbit ventricular myocytes: pharmacological analysis with KB-R7943. *Br. J. Pharmacol.* **126**:1785-1795.

# Effects of Endothelin-1 on Calcium and Potassium Currents in Guinea Pig Ventricular Cells

Li-Chu Tung\*, Jin-Tun Lin

Department of Life Science, National Taiwan Normal University  
Taipei, Taiwan

(Received: 6 August 2003, accepted: 8 November 2004)

## ABSTRACT

Endothelin-1 (ET-1), a 21 amino acid peptide, exerts a wide range of biological activities including vasoconstriction, mitogenesis, and inotropic effects on the heart. Action potential of guinea pig papillary muscle was recorded using traditioned microelectrode intracellular recording. The mechanical contractile force was recorded using a force-displacement transducer. The L-type calcium current ( $I_{Ca, L}$ ) and time-dependent potassium current ( $I_K$ ) in isolated guinea pig ventricular cardiomyocytes were recorded by the whole-cell patch clamp technique. Endothelin-1 (10 nM) had no effect on amplitude and duration of treated papillary muscle action potential. The mechanical contractile force, however, was increased as much as 225%. This effect was reversible after 2 min washing in ET-1 free superfusate. Extracellular application of ET-1 significantly decreased peak amplitude of  $Ca^{2+}$  currents by  $15 \pm 4\%$ ,  $24 \pm 6\%$ ,  $33 \pm 7\%$  and  $32 \pm 7\%$  in ventricular myocytes after treatment for 3, 6, 9, and 12 min, respectively. The treatments also have a 10 mV shift in relationship to membrane potential. The effect was irreversible after washing for 20 min. Endothelin-1 had no effect on the amplitude of  $I_K$ . This indicated that the incremental contractile force in ET-1 treated papillary muscles was not by action of increasing  $I_{Ca, L}$ .

**Keywords:** endothelin-1, L-type calcium currents, ventricular cells, guinea pig